

MODIFICATIONS DES PROFILS POLYPEPTIDIQUES LORS DE L'ÉTABLISSEMENT DE LA SYMBIOSE ECTOMYCORHIZIENNE

par Jean-Louis HILBERT et Francis MARTIN*

RÉSUMÉ. — Dans le but de mettre ■ évidence (i) les modifications induites dans l'expression des gènes fongiques et racinaires et (ii) les éventuels polypeptides spécifiques de l'état symbiotique, l'électrophorèse bidimensionnelle ■ été appliquée aux protéines solubles et membranaires du mycélium de *Pisolithus tinctorius*, des racines mycorrhizées et non mycorrhizées d'*Eucalyptus globulus*. Le niveau d'expression de 30 % des polypeptides fongiques et de plus de 50 % des polypeptides racinaires caractérisés, est modifié au cours de l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne. Les changements observés consistent en une diminution prononcée ou une augmentation de la concentration de nombreux polypeptides accumulés dans le mycélium ou la racine en culture pure. Quatre polypeptides (E₁₅, E₂₄, E₂₇, E₂₈), pour lesquels nous proposons le terme générique d'ectomycorhizines, ont été identifiés uniquement dans les ectomycorhizes. Ces polypeptides peuvent être synthétisés *de novo* dans les tissus symbiotiques ou apparaître comme de nouvelles isoformes, conséquence de modifications post-transcriptionnelles. L'abondance des ectomycorhizines rend probable leur rôle dans le développement de la symbiose.

ABSTRACT. — In an effort to examine the changes in protein patterns and for the presence of any «symbiosis-specific» genes, that are expressed specifically during the ectomycorrhizal development, the polypeptide content of *Eucalyptus-Pisolithus* ectomycorrhizas, uninfected *Eucalyptus globulus* short roots, and free-living *Pisolithus tinctorius* mycelia have been compared. Analysis of the soluble and membrane proteins by sodium dodecylsulfate- and two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis showed that the majority of the polypeptides observed in mycorrhizas are already synthesized in either uninfected roots or free-living mycelia. The levels of approximately 30 % of the fungal polypeptides and more than 50 % of the plant polypeptides resolved on gels are regulated during the development of ectomycorrhizas. Most of the changes detected involve ■ decrease or an increase in the concentration of proteins synthesized in free-living mycelia or root cells. Four polypeptides are ectomycorrhiza-specific in that they are present in ectomycorrhizas, but not in free living mycelia nor non-infected short roots. We suggest the name of ectomycorrhizins for this class of «ectomycorrhiza-specific» polypeptides. It seems likely that they have a role in the development of the symbiosis.

MOTS CLÉS : ectomycorhizes, électrophorèse bidimensionnelle, *Eucalyptus*, *Pisolithus*, ectomycorhizines.

* Laboratoire de Microbiologie Forestière, INRA, Centre de Recherches Forestières de Nancy, Champenoux, BP 35, 54280 Seichamps, France.

INTRODUCTION

De l'association entre le système racinaire des végétaux ligneux et certains champignons du sol résulte la formation d'actomycorhizes, organes symbiotiques jouant un rôle primordial dans la nutrition de la plante (LE TACON, 1985). Les recherches effectuées ces dernières années sur le métabolisme primaire des champignons ectomycorhiziens (MARTIN & al., 1987) et des ectomycorhizes (BLEDSOE & ZASOSKI, 1983), ont montré que la participation des différents partenaires à la symbiose modifie de nombreuses étapes de leur métabolisme primaire (MARTIN, 1986; MARTIN & al., 1987). L'établissement et le développement de la symbiose nécessitent l'intervention de mécanismes de reconnaissance (HARLEY & SMITH, 1983), des modifications dans les échanges cellulaires (HARLEY & SMITH, 1983) et les teneurs en catalyseurs enzymatiques (MARTIN & al., 1987). L'approche immunologique a ainsi permis de démontrer que la biosynthèse de la glutamate déshydrogénase à NADPH et de la glutamate oxaloacétate transaminase fongiques était réprimée dans l'ectomycorhize de Hêtre (CHALLOT, 1987). Au contraire, l'activité des phosphatases (MOUSAIN & SALSAC, 1982; LACAZE, 1983) et des catalyseurs de la voie des hexoses monophosphates (NASMYL, 1987) est fortement stimulée dans les tissus symbiotiques. Enfin, la mycorhization par *Rhizopogon vinicolor* des racines de *Pseudotsuga douglasii* conduit à la mise en place de mécanismes de résistance dont la manifestation est identique à celle observée lors de l'attaque des tissus végétaux par un champignon pathogène avec accumulation de tannins et de phytoalexines (COLEMAN & ANDERSON, 1985) dont la biosynthèse suppose l'induction de biocatalyseurs spécifiques (COLLINGE & SLUSARENKO, 1987). Ces remaniements enzymatiques et métaboliques multiples ne peuvent résulter que de modifications importantes dans l'expression des gènes des partenaires symbiotiques. La mise en place d'un nouveau métabolisme azoté et carboné dans l'ectomycorhize suggère également l'existence de gènes spécifiques qui gouverneraient la synthèse de protéines spécifiques de l'état symbiotique.

L'existence de protéines spécifiques d'un état symbiotique ■ été largement démontrée et étudiée chez les associations du type Légumineuses-*Rhizobium* (LEGOCKI & VERMA, 1980; STROZYCKI & al., 1985) où une quinzaine de polypeptides ont été caractérisés et pour certains leur rôle déterminé (VERMA & al., 1979; GOVERS & al., 1985). Dans le cas des relations plantes-pathogènes l'apparition de polypeptides spécifiques de l'état infecté a également été observé lors de l'infection par des virus, bactéries et champignons (GIANINAZZI, 1985; COLLINGE & SLUSARENKO, 1987).

Dans le but de mettre en évidence (i) les modifications induites dans l'expression des gènes fongiques et racinaires et (ii) les éventuels polypeptides spécifiques de l'état symbiotique, les profils électrophorétiques des racines non mycorhizées, du mycélium extramatriciel et des ectomycorhizes ont été comparées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

La synthèse axénique d'ectomycorhizes a été réalisée à partir d'*Eucalyptus globulus* Kirp et de *Pisolithus tinctorius* souche Cocker et Couch en employant la technique du «sandwich-paper» (CHILVERS & al., 1986). Des graines d'*Eucalyptus globulus* sont désinfectées 20 mn à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 20 % et mises à germer 3 jours sur papier absorbant. Les germinations exemptes de contamination sont transférées dans une boîte de Pétri (100 mm diam.) et alimentées par 20 ml de milieu gélosé de Shemakanova pendant 3 jours. Le champignon est placé sur un carton absorbant sur milieu gélosé renfermant de l'extrait de pomme de terre. Lorsque le mycélium recouvre le carton, les deux partenaires sont mis en contact. Après 4 semaines de développement en conditions axéniques les ectomycorhizes obtenues sont récoltées et conservées à -70°C .

La température de la chambre de croissance est maintenue à 22°C le jour et 16°C la nuit. L'hygrométrie est de 80 % de saturation. La photopériode est de 10 h avec une intensité lumineuse de $200\mu\text{einsteins}/\text{m}^2$ dans la bande des radiations visibles (400-700 nm).

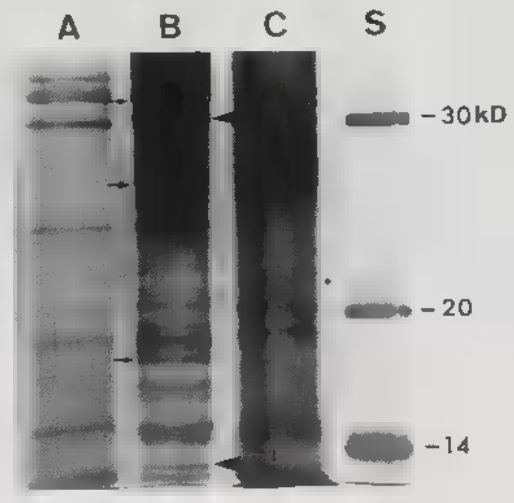
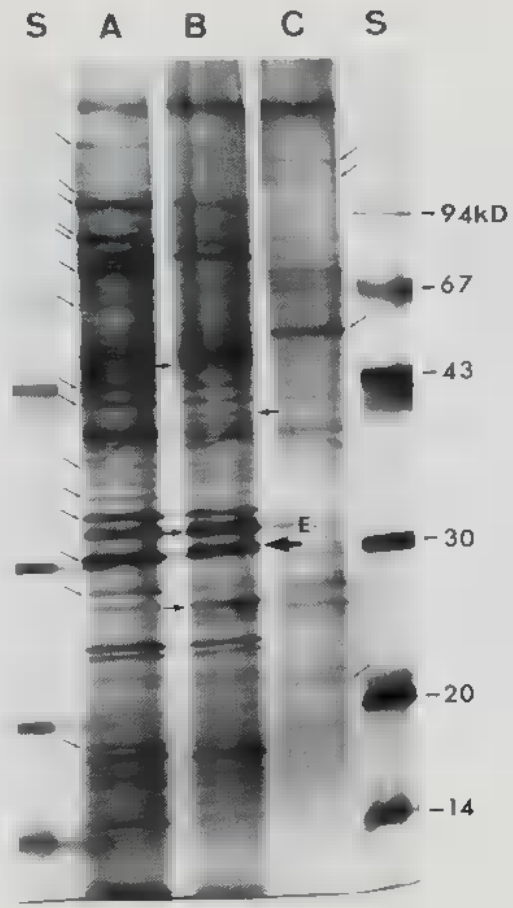
Extraction des protéines

L'extraction des protéines est effectuée à 4°C par broyage de matériel, dans un potter, en présence d'un tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5 contenant du phénylméthylsulfonylfluorure 1 mM, du dithiothréitol 5 mM, de l'acide ascorbique 1 mM, de l'éthylènediaminetétraacétate 1 mM et du Triton X100 0,1 %, après addition de polyvinylpyrrolidone insoluble à raison de 10 % (p/p). Après centrifugation à 10000 g pendant 30 mn, le surnageant renfermant les protéines solubles est prélevé. Un dosage de la quantité de protéines est réalisé à l'aide du réactif préconisé par Biorad d'après la technique de BRADFORD (1976). La quantité de protéines désirée par échantillon est ensuite mise à précipiter 45 mn à -20°C par addition de 5 volumes de mélange acide trichloroacétique 10 % (p/v), β -mercaptoéthanol 0.07 % (v/v) dans de l'acétone. Une centrifugation de 30 mn à 10000 g permet de recueillir les protéines sous forme d'un culot protéique. Celui-ci est rincé par 5 volumes du mélange β -mercaptoéthanol 0.07 % (v/v) dans de l'acétone, afin de débarrasser le culot de l'excès d'acide trichloroacétique. Une nouvelle centrifugation de 15 mn à 10000 g est effectuée, puis le culot protéique est séché au dessiccateur une nuit afin d'éliminer l'acétone. Les protéines sont solubilisées dans le tampon de lyse préconisé par O'FARRELL (1975) et dont la composition est la suivante : urée 9,5 M, Nonidet P40 2 % (v/v), ampholines 2 % (v/v) et β -mercaptoéthanol 5 % (v/v).

Électrophorèse

- Électrophorèse bidimensionnelle

Première dimension : les gels sont coulés dans des tubes de 1 mm de diamètre sur une longueur de 12,5 cm. Ils contiennent en composition finale 3,5 % d'acry-



lamide, 0,24 % de méthylène bisacrylamide, 9,2 M d'urée, 4 % d'ampholines (3/4 de Pharmacia 5-8, 1/4 de LKB 3,5-10) et 2 % de Nonidet P40. Les solutions d'électrodes sont de l'acide phosphorique 10 mM et de la soude NaOH 20 mM. Les paramètres électriques de l'isofocalisation sont une puissance de 1 W pour 8 gels, voltage toujours limité à 1200 V, intensité non limitée. L'électrophorèse est arrêtée après passage de 21000 V.H.

Un dépôt d'environ 150 µg de protéines par gel est effectué. Après l'isoélectrofocalisation, les gels sont extrudés des tubes par pression à l'aide d'une seringue et sont mis en agitation douce 15 mn dans 5 ml d'un tampon d'équilibration préconisé par O'FARRELL (1975) mais dont nous avons supprimé le β-mercaptoéthanol qui provoque des artefacts lors de la révélation argentique (TASHEVA & DESSEV, 1983). La composition de ce tampon d'équilibration est la suivante : Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, sodium dodécyl sulfate 2,3 %, glycérol 10 % (m/v), bleu de bromophénol : 150 µl d'une solution à 0,05 %.

Deuxième dimension : le gel de séparation des protéines est coulé entre deux plaques de verre (140 x 150 x 1 mm). La concentration finale est de 15 % en acrylamide-bisacrylamide. Il n'y a pas de gel de concentration des protéines. Le gel de 1ère dimension, après passage dans le tampon d'équilibration, est déposé sur le gel de séparation. Il n'y a pas de gel de soudure. Le tampon d'électrophorèse est celui de LAEMMLI (1970) : Tris 0,025 M, glycine 0,192 M, SDS 0,1 %. Les conditions électriques sont de 1 W par gel pendant 10 mn puis de 6W jusqu'à la fin de la migration, voltage et intensité non limités.

- Électrophorèse monodimensionnelle

Les protéines sont préparées comme pour l'électrophorèse bidimensionnelle, cependant leur solubilisation est effectuée par reprise du culot protéique dans du tampon de LAEMMLI (1970) : Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8, glycérol 10 %, sodium dodécyl sulfate 2 %, mercaptoéthanol 5 %, bleu de bromophénol 0,01%. L'ensemble est chauffé à 100°C pendant 5 mn. Le gel de séparation des protéines est de composition identique à celui utilisé pour la 2ème dimension lors de l'électrophorèse bidimensionnelle. Après polymérisation il est recouvert d'un gel de concentration des protéines de concentration finale à 5 % en acrylamide-bisacrylamide. Le gel de concentration est coulé après insertion d'un peigne

Figure 1 : Profil électrophorétique monodimensionnel des protéines solubles de *Pisolithus tinctorius* (A), d'*Eucalyptus globulus* (C) et des ectomycorhizes obtenues à partir de leur association (B). (∨) = polypeptides dont l'accumulation est réduite dans la mycorhize. (→) = polypeptides dont l'accumulation est augmentée dans la mycorhize (→E) = polypeptides spécifiques de la symbiose. Le puit S contient les protéines standards de poids moléculaire dans l'ordre suivant 14,4; 20,1; 30,0; 43,0; 67,0 et 94,0 kD.

Figure 1 : Silver-stained SDS-gel of polypeptides of *Pisolithus tinctorius* (A), *Eucalyptus globulus* (C) and their ectomycorrhizas (B). Extracted proteins were boiled in an SDS-containing solution and proteins equivalent to 150 µg bovine serum albumin in the protein assay were loaded into each lane. Lane S shows protein markers of the following molecular weights : 14.4; 20.1; 30.0; 43.0; 67.0; 94.0 kD.



Figure 2 : Électrophorégramme bidimensionnel des protéines solubles extraites à partir du mycélium libre de *Pisolithus tinctorius*. 1ère dimension : isofocalisation (IEF) dans un gradient de pH variant de 7 (droite) à 5 (gauche); 2ème dimension : gel de polyacrylamide 15 % ■ présence de sodium dodécyl sulfate.

Figure 2 : Silver-stained two-dimensional gel of polypeptides of free-living mycelia of *Pisolithus tinctorius*. Proteins were loaded into the basic end of ■ tube gel for the first dimension electrophoresis (isoelectrofocusing). The gel was run, equilibrated, and loaded onto the second sodium dodecyl sulfate-dimension (15 % acrylamide).

qui permettra la formation des puits dans lesquels seront déposés les échantillons protéiques. De 4 à 5 μg de protéines sont déposés par puit. La révélation des protéines est effectuée par coloration argentique d'après MORRISSEY (1981).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La chromatographie par électrophorèse dénaturante des protéines solubles et membranaires du mycélium de *Pisolithus tinctorius* (Fig. 1A), des racines mycorrhizées (Fig. 1B) et non mycorrhizées (Fig. 1C) d'*Eucalyptus globulus* permet l'observation d'une centaine de polypeptides dans les tissus des partenaires étudiés isolément et dans les ectomycorhizes.

La comparaison de ces profils polypeptidiques met en évidence des modifications quantitatives et qualitatives importantes dans l'accumulation des pro-

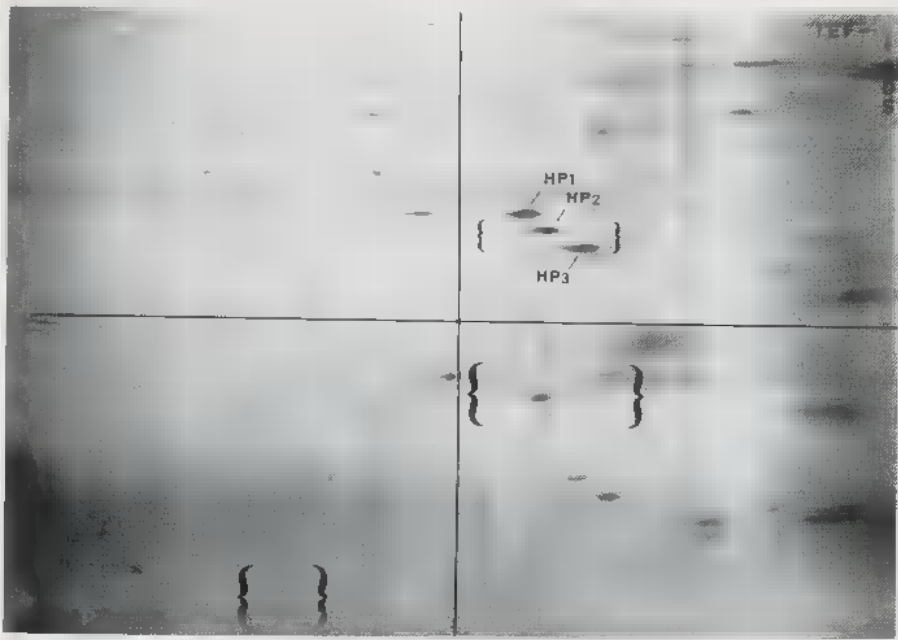


Figure 3 : Électrophorégramme bidimensionnel des protéines solubles extraites à partir des racines courtes latérales d'*Eucalyptus globulus* non associés à *Pisolithus tinctorius*.

Figure 3 : Silver-stained two-dimensional gel of polypeptides of non-mycorrhizal short roots of *Eucalyptus globulus*.

téines. La composition polypeptidique des ectomycorhizes (Fig. 1B), prélevées 4 semaines après l'infection, est très proche de celle des hyphes fongiques cultivées isolément (Fig. 1A) suggérant que le contenu protéique des mycorhizes est essentiellement d'origine fongique. Il s'agit là d'une confirmation biochimique des multiples observations microscopiques (KOTTKE & OBERWINKLER, 1986) soulignant la richesse relative en organites du cytoplasme fongique constituant le réseau de Hartig et la vacuolisation intense des cellules corticales de la racine mycorhizée. Toutes les ectomycorhizes étudiées (*Pinus nigra-Hebeloma crustuliniforme*, *Picea abies-Hebeloma* sp., ... [HILBERT, EL ABRAS & MARTIN, résultats non publiés]) présentent la même caractéristique que celle des mycorhizes de *Pisolithus-Eucalyptus*.

Si la plupart des polypeptides du mycélium en culture pure sont synthétisés dans les ectomycorhizes, plus de 20 % d'entre eux voient leur concentration fortement diminuée (Fig. 1A-B) indiquant des modifications dans leur taux de renouvellement et/ou leur biosynthèse. Ces protéines pourraient contrôler des processus dont l'activité est fortement limitée par l'établissement de la mycorhize tels que la croissance hyphale et la biosynthèse des parois. Certains

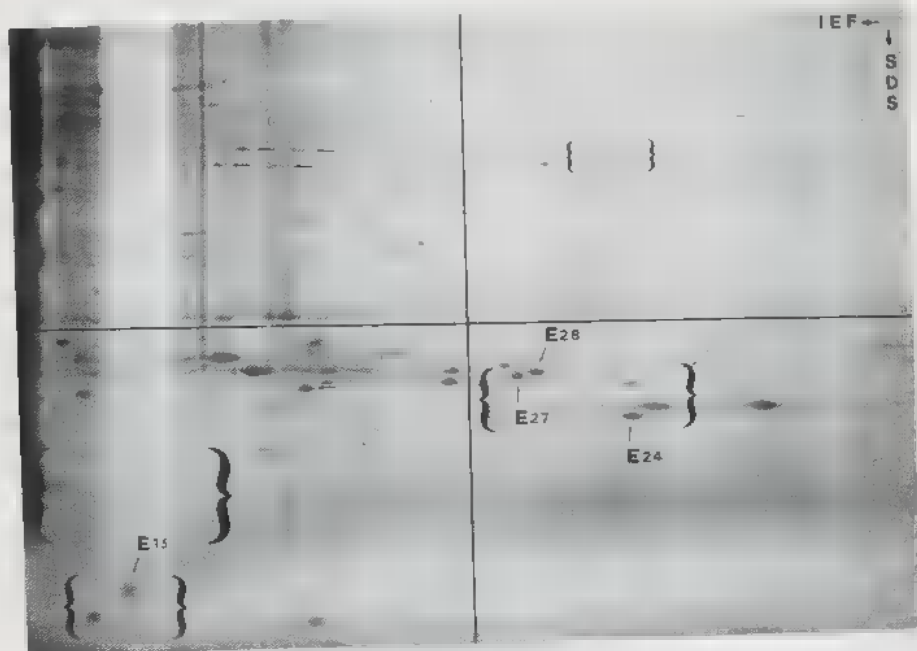


Figure 4 : Électrophorégramme bidimensionnel des protéines solubles extraites à partir des ectomycorhizes résultant de l'association entre *Pisolithus tinctorius* et *Eucalyptus globulus*. E15, E24, E27, E28 : polypeptides spécifiques de la symbiose (= ectomycorhizines).

Figure 4 : Silver-stained two-dimensional gel of polypeptides of short roots of *Eucalyptus globulus* infected by *Pisolithus tinctorius*. E15, E24, E27, E28 : symbiosis-specific polypeptides (= ectomycorrhizins).

polypeptides racinaires sont également accumulés en moindre quantité dans les organes symbiotiques (Fig. 1B-C), mais la faible abondance des protéines végétales limite l'observation du phénomène.

Enfin, l'infection des racines courtes d'*E. globulus* par *P. tinctorius* induit l'accumulation de polypeptides n'existant pas dans les cellules fongiques et racinaires cultivées séparément. Deux polypeptides, dont les poids moléculaires sont respectivement de 12 kD (annoté E1, Fig. 1B) et 30 kD (annoté E, Fig. 1B), s'accumulent en grande quantité.

L'étude des modifications quantitatives et qualitatives de tissus aussi riches en polypeptides que les ectomycorhizes nécessitait une technique électrophorétique plus résolutive que l'électrophorèse dénaturante. L'électrophorèse bidimensionnelle a donc été développée et appliquée aux protéines solubles et membranaires du mycélium de *Pisolithus tinctorius* (Fig. 2), des racines mycorhizées (Fig. 4) et non mycorhizées (Fig. 3) d'*Eucalyptus globulus*. La carte

polypeptidique du mycélium permet l'observation de 135 spots parfaitement résolus (Fig. 2). La majorité de ces polypeptides sont neutres et acides et ont un poids moléculaire inférieur à 30 kD. Les polypeptides des racines non mycorrhizées (Fig. 3) sont moins nombreux et sont pour l'essentiel de haut poids moléculaire et neutres.

L'essentiel des polypeptides observés dans les mycorrhizes (Fig. 4) est également détecté dans le mycélium de *Pisolithus tinctorius* ou dans la racine non infectée et préexistent donc dans les tissus non symbiotiques. Le profil polypeptidique des organes symbiotiques est composé majoritairement de polypeptides d'origine fongique confirmant ainsi les données de l'électrophorèse dénaturante (Fig. 1). Le développement des ectomycorrhizes est toutefois accompagné par la diminution et l'apparition de nombreux polypeptides. Il est à noter une diminution plus prononcée des polypeptides racinaires que des polypeptides fongiques. Sur les 135 polypeptides fongiques résolus, 30 % sont exprimés de façon différente dans la symbiose; 17 voient leur concentration diminuée : il s'agit de molécules de faible poids moléculaire et ayant un point isoélectrique acide (quadrant 4, Fig. 2 et 4). La quantité d'au moins 4 polypeptides augmente.

Dans les tissus de la plante, 125 polypeptides sont caractérisés sur les racines courtes latérales non infectées. La majorité d'entre eux voient leur concentration fortement diminuée (e. g., HP1, HP2, HP3; quadrant 2, Fig. 3 et 4) dans les ectomycorrhizes. L'établissement de la symbiose se manifeste clairement par la répression de la biosynthèse de nombreuses protéines fongiques et racinaires. Les ectomycorrhizes se caractérisent donc par une simplification des profils polypeptidiques.

Enfin, 4 polypeptides (E₁₅, E₂₄, E₂₇, E₂₈) (Fig. 4) sont spécifiques de la symbiose *P. tinctorius* - *E. globulus*, étant présents dans les ectomycorrhizes et absents du mycélium en culture pure et des racines non infectées. Leurs poids moléculaires et points isoélectriques sont respectivement de 15 kD (5,8), 24 kD (6,9), 27 kD (6,5) et 27,3 kD (6,6). Ces polypeptides sont abondants et les propriétés physico-chimiques voisines de E₂₄, E₂₇, et E₂₈ suggèrent une parenté entre ces 3 polypeptides.

CONCLUSION

Les niveaux d'expression de 30 % des polypeptides fongiques et de plus de 50 % des polypeptides racinaires caractérisés par électrophorèse bidimensionnelle, sont modifiés au cours de l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne. Les changements observés consistent en une diminution prononcée ou une augmentation de la concentration de nombreux polypeptides accumulés dans le mycélium ou la racine en culture pure. La répression qui affecte la biosynthèse des polypeptides, d'origine fongique et racinaire, confirme les observations biochimiques (MARTIN & al., 1987) et microscopiques (DEXHEIMER & al., 1986) démontrant les modifications induites chez les symbiotes par l'établissement de l'ectomycorhize. Quatre polypeptides (E₁₅, E₂₄, E₂₇, E₂₈), pour

lesquels nous proposons le terme générique d'**ectomycorhizines**, ont été identifiés uniquement dans les ectomycorhizes. Ces polypeptides peuvent être synthétisés *de novo* dans les tissus symbiotiques ou apparaître comme de nouvelles isoformes, conséquence de modifications post-transcriptionnelles. La compartimentation de ces polypeptides spécifiques n'a pas été déterminée et, de ce fait, l'appartenance des gènes codant pour les ectomycorhizines à l'un ou l'autre des génomes reste à déterminer. Des études sont en cours afin de caractériser (i) la nature (glycoprotéines, protéines membranaires, enzymes, ...) et les fonctions des ectomycorhizines et (ii) leur mécanisme d'induction. L'abondance des ectomycorhizines rend probable un rôle dans le développement de la symbiose. Elles constituent un outil remarquable dans l'étude de la physiologie du développement de la symbiose ectomycorhizienne et permettra, en particulier, de tester l'existence de médiateurs chimiques assurant l'échange d'informations entre les symbiotes.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Mrs F. Lapeyrie et F. Le Tacon (Laboratoire de Microbiologie Forestière), ainsi que le Professeur B. Botton (Laboratoire de Physiologie Végétale et Forestière) pour les discussions et encouragements prodigués au cours de la présente étude.

BIBLIOGRAPHIE

- BLEDSON C. and ZASOSKI R.J., 1983 — Effects of ammonium and nitrate on growth and nitrogen uptake by mycorrhizal Douglas-fir seedlings. *Pl. & Soil* 71 : 445-454.
- BRADFORD M.M., 1976 — A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* 72 : 248-254.
- CHALLOT M., 1987 — Influence de la mycorrhization sur le métabolisme azoté et le développement d'espèces forestières. Application au Douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) et à l'épicéa (*Picea abies* L. Karsten). DEA Université de Nancy I, U.E.R. Physique-Chimie-Biologie.
- CHILVERS G.A., DOUGLASS P.A. and LAPEYRIE F.F., 1986 — A paper-sandwich technique for rapid synthesis of ectomycorrhizas. *New Phytol.* 103 : 397-402.
- COLEMAN M.W. and ANDERSON A.J., 1985 — The role of elicitors in ectomycorrhizal formation. In : R. MOLINA, *Proc. 6th North Am. Conf. Mycorrhizae*. Oregon State University Press : 361-362.
- COLLINGE D.B. and SLUSARENKO A.J., 1987 — Plant gene expression in response to pathogens. *Pl. Molec. Biol.* 9 : 389-410.
- DEXHEIMER J., AUBERT-DUFRESNE M.P., GERARD J., LE TACON F. et MOUSAIN D., 1986 — Étude de la localisation ultrastructurale des activités phosphatases acides dans deux types d'Ectomycorhizes : *Pinus nigra nigricans*/ *Heleboma crustuliniforme* et *Pinus nigra pinaster*/ *Pisolithus tinctorius*. *Bull. Soc. Bot. France* 133, *Lettres Bot.* : 343-352.

- GIANINAZZI S., 1985 — Genetic and molecular aspects of resistance induced by infections or chemicals. In : T. KOSUGE & E.W. NESTER, *Plant-Microbe Interactions*. New York, Macmillan Publishing Company : 312-342.
- GOVERS S., GIOUDEMANS T., MOERMAN M., VAN KAMMEN A. and BISSELING T., 1985 — Expression of plant genes during the development of pea root nodules. *EMBO J.* 4 : 816-817.
- HARLEY J. and SMITH S., 1983 — *Mycorrhizal symbiosis*. London, Academic Press.
- KOTTKE I. and OBERWINKLER F., 1986 — Mycorrhiza of forest trees - structure and function. *Trees* 1 : 1-24.
- LACAZE B., 1983 — Localisation cytochimique des activités phosphatasiques acides de champignons mycorrhiziens développés sur milieu complet ou carencé en phosphate. *Canad. J. Bot.* 61 : 1411-1414.
- LAEMMLI U.K., 1970 — Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227 : 680-685.
- LEGOCKI P. and VERMA D.P.S., 1980 — Identification of «nodule-specific» host proteins (nodulins) involved in the development of Rhizobium-legume symbiosis. *Cell* 20 : 153-163.
- LE TACON F., 1985 — Les mycorrhizes : une coopération entre plantes ■ champignons. *La Recherche* 166 : 624-632.
- MARTIN F., 1986 — Contribution à l'étude du métabolisme primaire de symbiotes ectomycorhiziens. Thèse d'État, Université Paris-Sud.
- MARTIN F., RAMSTEDT M. and SÖDERHÄLL K., 1987 — Carbon and nitrogen metabolism in ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. *Biochimie* 69 : 569-581.
- MORRISSEY J.H., 1981 — Silver stain for proteins in polyacrylamide gels : a modified procedure with enhanced sensitivity. *Analytical Biochem.* 117 : 307-310.
- MOUSAIN D. et SALSAC L., 1982 — Nutrition phosphatée et activités phosphatases acides des symbiotes ectomycorhiziens cultivés isolément ou en association. *Les Colloques de l'INRA* 13 : 87-100.
- NASMYL C., 1987 — Effets de la mycorrhization sur le métabolisme carboné des racines d'Épicéa (*Picea abies* L. Karsten). Approche enzymatique liée au déperissement. D.E.A. Université de Nancy I.
- O'FARRELL P.H., 1975 — High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250 : 4007-4021.
- STROZYCKI P., KONIECZNY A. and LEGOCKI A.B., 1985 — Identification and synthesis in vitro of plant-specific proteins in yellow lupin root nodules. *Acta Biochim. Polon.* 32 : 27-34.
- TASHEVA B. and DESSEV G., 1983 — Artifacts in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis due to 2-mercaptoethanol. *Analytical Biochem.* 129 : 98-102.
- VERMA D.P.S., BALL S., GUERIN C.W. and WANAMAKER L., 1979 — Leghaemoglobin biosynthesis in soybean root nodules characterization of the nascent and released peptides and the relative rate of synthesis of the major leghaemoglobins. *Biochemistry* 18 : 476-483.